

10/528992  
Rec'd PCTO 24 MAR 2005

PCT/JP03/11766

10.10.03

#2

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

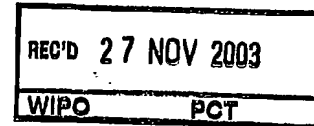
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2002年9月24日

出願番号  
Application Number: 特願2002-277214  
[ST. 10/C]: [JP2002-277214]

出願人  
Applicant(s): アークレイ株式会社

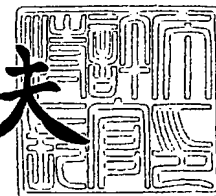


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3093653

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 185586

【提出日】 平成14年 9月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/06  
C12Q 1/26  
C12R 1:77

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県奈良市学園南3丁目15-35 学園南ハイツ1  
02号

【氏名】 吉田 信行

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市北区上賀茂菖蒲園町56, 60番合地-1

【氏名】 谷 ▲吉▼樹

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 アークレイ  
株式会社内

【氏名】 米原 聡

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町57番地

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100086405

【弁理士】

【氏名又は名称】 河宮 治

【選任した代理人】

【識別番号】 100068526

【弁理士】

【氏名又は名称】 田村 恭生

【選任した代理人】

【識別番号】 100087114

【弁理士】

【氏名又は名称】 齋藤 みの里

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 受託証(写) 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。

【包括委任状番号】 9702569

【プルーフの要否】 要

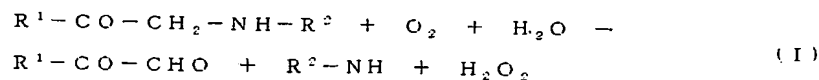
【書類名】 明細書

【発明の名称】 フルクトシルアミノキシダーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(I) :

【化1】



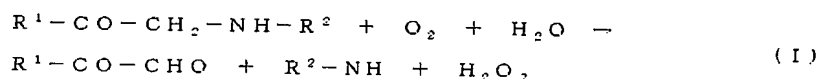
(式中、 $R^1$ は $-[CH(OH)]_n-CH_2OH$  ( $n$ は5または6である)、 $R^2$ はアミノ酸残基またはアミノ酸2～10個のペプチド残基を表す)

で示される反応における触媒活性を有するフルクトシルアミノキシダーゼ。

【請求項2】  $R^2$ がバリンまたはリジン残基であるか、N末端がバリンまたはリジンであるアミノ酸2～10個のペプチド残基である、請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項3】 式(I) :

【化2】

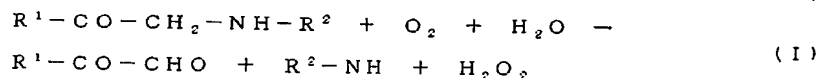


(式中、 $R^1$ は $-[CH(OH)]_n-CH_2OH$  ( $n$ は5または6である)、 $R^2$ はアミノ酸残基またはアミノ酸2～10個のペプチド残基を表す)

で示される反応における触媒活性を有し、フルクトシルバリン、N- $\alpha$ フルクトシルリジンのいずれに対しても活性があり、好適なpHが約7～9であり、好適な温度が約30～40℃である、フルクトシルアミノキシダーゼ。

【請求項4】 式(I) :

【化3】



(式中、 $R^1$ は $-[CH(OH)]_n-CH_2OH$  ( $n$ は5または6である)、 $R^2$ はアミノ酸残基またはアミノ酸2～10個のペプチド残基を表す)

で示される反応における触媒活性を有し、糖化アミノ酸としてフルクトシルバリン、糖化ペプチドとしてフルクトシルバリナーヒスチジンまたはフルクトシルバリナーヒスチジンーロイシンに対して活性があり、好適なpHが約6.5～9であり、好適な温度が約30～40℃である、フルクトシルアミノキシダーゼ。

【請求項5】 フルクトシルバリナーヒスチジンまたはフルクトシルバリナーヒスチジンーロイシンに対する資化能を有する微生物により産生されるものである、請求項1～4のいずれか1項に記載のフルクトシルアミノキシダーゼ。

【請求項6】 フルクトシルバリナーヒスチジンまたはフルクトシルバリナーヒスチジンーロイシンに対する資化能を有する微生物がフサリウム属の菌株である、請求項5に記載のフルクトシルアミノキシダーゼ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、新規なフルクトシルアミノキシダーゼに関し、さらに詳しくは、糖化アミノ酸および糖化ペプチドに対して活性を有するフルクトシルアミノキシダーゼに関する。

【0002】

【従来技術】

アマドリ化合物は、血液や食品中のタンパク質、ペプチドおよびアミノ酸のようなアミノ基を有する物質と、例えばグルコースのような還元性の糖が共存する場合、アミノ基とアルデヒド基が非酵素的かつ非可逆的に結合し、アマドリ転移することにより生成される。アマドリ化合物の生成速度は、反応性物質の濃度、接触時間、温度などの関数で表される。従って、その生成量から、それら反応性物質を含有する物質に関する様々な情報を得ることができることから、アマドリ化合物の分析は、医療分野、食品分野等で有用である。特に医療分野で注目されているのは、糖尿病の診断および管理の指標としての糖化タンパクである。糖尿病は、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害を初め様々な全身症状

(合併症)を引き起こす疾患であり、失明や透析導入の最も主要な原因となっている。これらの合併症は、患者の生活や社会活動を制限するばかりか医療費の増加にもかかわっており、深刻な社会問題である。従って、糖尿病の早期発見と発見後の適切な血糖コントロールの重要性が指摘されている。糖尿病における血糖コントロールの指標として、通常、過去約1～2ヶ月の平均血糖値を反映する糖化ヘモグロビン、過去約2週間の平均血糖値を反映する糖化アルブミン、あるいは血清中の還元能を示す糖化タンパク質を意味するフルクトサミン等が測定される。糖化ヘモグロビン(HbA1c)はヘモグロビンの $\beta$ 鎖N末端バリンの $\alpha$ -アミノ基が糖化されたものであるため、HbA1cの測定は糖尿病患者の血糖コントロールにおいて重要な役割を占めている。

#### 【0003】

アマドリ化合物の酵素法による分析は、アマドリ化合物に酸化還元酵素を作用させ、生成する過酸化水素量または消費される酸素量に基づいて、その量を測定することで行われる。該酸化還元酵素の一つであるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼは、通常、微生物から精製されている(例えば特許文献1～6参照)。これらの文献に記載の酵素について簡単に説明すると、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属由来の酵素には $\alpha$ -アミノ基糖化アミノ酸に特異的であり、フルクトシルリジン(以下、「FL」と称することもある)には作用しないものがあるが、これは熱安定性が悪く(45℃、10分の熱処理で90%以上失活)実用性に乏しい(特許文献1参照)。アスペルギルス属(*Aspergillus*)由来の酵素には、FLに対する活性が、フルクトシルバリン(以下、「FV」と称することもある)に対する活性より低いものがあるが、その糖化タンパク又はその加水分解物に対する作用については不明である(特許文献2参照)。ギベレラ属(*Gibberella*)属由来の酵素には $\alpha$ -アミノ基が保護された、フルクトシルN $\alpha$ -Z-リジン(以下、FZLと称することもある)に対して高い特異性を有し、フルクトシルポリリジンに対して活性があるが、フルクトシルバリンには作用しないものがある(特許文献3参照)。また、フサリウム属(*Fusarium*)が産生する酵素にはフルクトシルリジンに対する活性がフルクトシルバリンに対する活性と同等かより高いものがある(特許文献4参照)。また、他のフサリウム属やジベレラ属から産生

される酵素にはフルクトシルバリンには作用せず、フルクトシルリジンに特異的なものもある（特許文献 5 参照）。

【 0 0 0 4 】

【特許文献 1】

特公平 6-65300 号公報

【特許文献 2】

特開平 3-155780 号公報

【特許文献 3】

特開平 7-289253 号公報（段落番号 0031、0037）

【特許文献 4】

特開平 8-154672 号公報（請求項 2、段落番号 0027）

【特許文献 5】

特開平 11 - 243950 号公報（段落番号 0037）

【特許文献 6】

特開平 5 - 192193 号公報

【 0 0 0 5 】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、既存の酵素では、例えば糖化ヘモグロビンの測定に充分満足できないことから、活性が高く、特異性に優れた酵素が望まれていた。さらに、これら既存の酵素では、プロテアーゼ処理等により断片化処理された糖化アミノ酸や糖化ポリリジンに対する活性は認められるが、 $\alpha$  位が糖化された糖化ペプチドに対する活性は殆ど認められない。従って、例えば、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基を N-末端に有する糖化ヘモグロビンの場合は、N-末端のフルクトシルバリンを確実に遊離させる必要がある。従来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを用いて糖化タンパクを正確に測定しようとする場合には、該酵素の基質となる糖化アミノ酸を確実に遊離させることが前提となるが、実際には、目的の糖化アミノ酸を確実に遊離させる方法はなく、それを可能にするほど特異性の高いプロテアーゼも提供されていない。この問題を解決する一つの方法は、N末端が糖化されたペプチドに反応し得るフルクトシルアミノオキシダーゼを測定に使

用することである。とりわけ糖尿病のコントロールに重要なヘモグロビンA1c (HbA1c) を正確かつ効率良く測定するには断片化産物としての糖化ペプチドにも活性なフルクトシルアミノキシダーゼが必要である。

従って、本発明はアマドリ化合物、特に糖化タンパクを正確かつ効率良く測定するために、新規で有用なフルクトシルアミノキシダーゼ（以下、「FAO」と呼称することもある）を提供することを目的するものである。

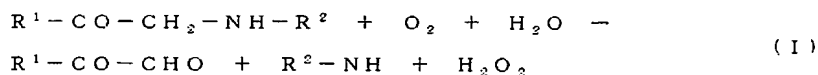
#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ある種の微生物が基質特異性において優れたFAOを産生することを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、式（I）：

##### 【化4】



（式中、 $R^1$ は $-[CH(OH)]_n-CH_2OH$ （ $n$ は5または6である）、 $R^2$ はアミノ酸残基またはアミノ酸2～10個のペプチド残基を表す）

で示される反応における触媒活性を有するフルクトシルアミノキシダーゼを提供するものである。

#### 【0007】

上記の式（I）において、 $R^2$ はアミノ酸残基またはアミノ酸2～10個のペプチド残基であり、好ましくは、アミノ酸残基またはアミノ酸2～6個のペプチド残基、より好ましくはアミノ酸残基またはアミノ酸2～3個のペプチド残基である。

$R^2$ を構成するアミノ酸は測定すべきアマドリ化合物により異なるが、例えば、バリン、リジン、ヒスチジン、ロイシン、セリンを挙げることができる。 $R^2$ がペプチド残基である場合は、バリンまたはロイシンをN-末端に含む2～10個のアミノ酸からなるペプチド残基である。バリンをN末端に有するアミノ酸数2～3個のペプチド残基がより好ましく、そのようなペプチドの具体例として、



バリナーヒスチジン、バリナーヒスチジンーロイシンが挙げられる。

【0008】

本発明のFAOがHbA1cの測定に用いられるものである場合、上記のごとく、 $\alpha$ -アミノ基が糖化されたバリン、即ちフルクトシルバリン(FV)、またはFVをN末端に有するペプチドに対して活性があることが好ましい。一方、糖化アルブミンの測定に用いられるものである場合、糖化アルブミン分子ではリジンの $\epsilon$ -アミノ基が糖化されていることから、 $\epsilon$ -アミノ基が糖化されたフルクトシルリジン( $\epsilon$ FL)または $\epsilon$ FLを含むペプチドに対して活性があることが好ましい。

【0009】

本発明のFAOは、酵素作用を有する限りその起源は特に制限されない。例えば、特定の糖化アミノ酸または糖化ペプチドのみを炭素源および窒素源として含有する培地で育成する微生物により産生され、糖化アミノ酸および糖化ペプチドを基質として酵素活性を発揮するFAOは本発明に有用である。上記の微生物のスクリーニングに用いる糖化ペプチドとしては、目的の糖化タンパクを断片化した場合に生成されるものが例示される。そのような糖化ペプチドのみを炭素源および窒素源とする培地で培養した菌体より酵素を精製し、その活性を確認することにより、目的のFAOを得ることができる。後述するように、本発明者らはフルクトシルバリナーヒスチジンーロイシン(FVHL)を用いて土壤中の微生物をスクリーニングし、FVHL資化能を有する、フサリウム属(*Fusarium*)の微生物を見出した。

なお、上記のFVHLは、ヘモグロビン $\beta$ 鎖のN末端と同じ配列を有していることから、該ペプチドはHbA1cの測定に有用なFAOをスクリーニングするのに好適である。そのような糖化ペプチドは当該技術分野で既知の方法で製造することができる。

【0010】

従って、本発明のFAOはフサリウム属の菌株を用いて微生物学的に製造することができる。好ましい微生物は*Fusarium* sp. GL2-1またはその変異体である。

*Fusarium* sp. GL2-1株(以下、「GL2-1株」と略称する)は、実施例1に

記載の方法により、本発明者らが土壤中から新たに分離した菌株であり、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 FERM P-19005 の下で寄託されている（受託日：平成14年9月9日）。

#### 【0011】

GL2-1株を親株として、変異体誘導や組換え遺伝子技術などにより、FVHLや他の基質に対する活性が高められた派生菌株を得ることができる。そのような変異株も本発明の範囲内である。そのような派生菌株は、人為的に突然変異を誘発されたものや、スクリーニングで得られたもの等を包含する。

#### 【0012】

本発明のFAOは、グルコース-バリン褐変化培地（以下、GV褐変化培地と称する）でFAO産生能を有する微生物を培養したとき、誘導される。GV褐変化培地は、グルコースとバリンを温度120℃において30分間、オートクレーブ処理することにより得られる。好ましいGV褐変化培地の例として、グルコース1.5%、L-バリン0.5%、 $K_2HPO_4$ 0.1%、 $NaH_2PO_4$ 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01%、酵母エキス0.2%を含有する培地を挙げることができる。

#### 【0013】

培養は、通常、25～37℃、好ましくは28℃で行われる。培地のpHは4.0～8.0の範囲であり、好ましくは5.5～6.0である。しかしながら、これらの条件は、それぞれの菌の状態に応じて適宜調整されものであり、上記に限定されない。

例えば、GL2-1株をこのような条件下、12～36時間、好ましくは24時間培養すると、FAOが培養物に蓄積される。このようにして得られた培養物から、常法に従ってろ過することにより、核酸、細胞壁断片等を除去し、酵素標品を得ることができる。通常、酵素活性は菌体中に蓄積されるので、培養物中の菌を磨碎し、酵素を抽出する。細胞の磨碎は、機械的手段または溶媒を利用した自己消化、凍結、超音波処理、加圧などのいずれでもよい。

#### 【0014】

酵素の分離精製法も既知であり、硫酸などを用いる塩析、エタノール等の有機

溶媒による沈殿、イオン交換クロマトグラフィやゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィなどを、適宜組み合わせて行う。

例えば、培養物を、遠心または吸引ろ過して菌糸体を集め、洗浄後、1 mM DTTを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、ミニビードベータ (ガラスビーズ 0.5 mm) で菌糸体を破碎し、遠心分離して得た上清 (無細胞抽出液) を硫酸分画し、透析した後、Resource Q カラムクロマトグラフィー (ファルマシア製) で処理することにより精製する。

#### 【0015】

あるいは、FAO が培地中に分泌または蓄積される場合は、それ自体既知の方法に従い、例えば、イオン交換樹脂処理法、活性炭吸着処理法、有機溶媒沈殿法、減圧濃縮法、凍結乾燥法、結晶化法等を適宜組み合わせて分離精製することができる。

#### 【0016】

以上に述べた方法で、GL2-1 株の培養物から、Resource Q カラムクロマトグラフィーで異なる保持時間を示す、少なくとも 2 種類の、GL2-1 株由来の FAO を得た。1 つはフルクトシルバリリン (FV) および N- $\alpha$  フルクトシルリジン (FZL) の両方に活性な酵素 (以下、「FAO-Q1」と称する) であり、他方は FV には活性があるが、FZL には活性を示さない酵素 (以下、「FAO-Q2」と称する) である。なお、本明細書では、GL2-1 株が産生する FAO-Q1, FAO-Q2 についてその製造や同定に関して記載しているが、本発明は特定の起源に限定されず、本発明の目的に適う、下記の特性を有する全 FAO を包含する。

#### 【0017】

本発明の GL2-1 株由来の酵素について以下に詳細に説明する。

##### FAO-Q1

- 1) フルクトシルバリリン (FV)、N- $\alpha$  フルクトシルリジン (FZL) に対して活性である；
- 2) 好適な pH は約 7~9、好ましくは約 7~8、より好ましくは約 7.5 である。

3) 好適な温度は約 30～40℃である。

FAO-Q2

1) フルクトシルバリン (FV)、フルクトシルバリンーヒスチジンーロイシン (FVHL) に対して活性がある。

2) 好適な pH は約 6.5～9、好ましくは約 7～8、より好ましくは約 7 である。

3) 好適な温度は約 30～40℃である。

#### 【0018】

これら 2 つの酵素の一般的な特性は以下の通りである。

##### 1. 一般的な誘導特性

いずれも FVHL によって誘導される誘導酵素であり、FVHL を唯一の炭素源および窒素源とする培地で誘導される。

#### 【0019】

##### 2. 反応特異性および基質特異性

GL2-1 株の培養物から部分精製した酵素は、実施例 2 (2) に記載されているように、Resource Q カラムクロマトグラフィーにおいて、異なる保持時間を示す活性な画分 Q1、Q2 を含んでいた。これら画分に含まれる酵素をそれぞれ「FAO-Q1」および「FAO-Q2」と呼称する。FAO-Q1 は FV および FZL の両方に同程度の活性を有し、かつ FVL にも活性であり、他方、FAO-Q2 は FV には活性であり、FVH、FVHL という N-末端バリンが糖化されたペプチドにも活性を示したが、FZL には活性を示さなかった。

#### 【0020】

##### 3. pH および温度の条件

###### pH 条件の測定

酵素の pH 特性は、0.1 M 酢酸、リン酸カリウム (K-P)、Tris-HCl およびグリシン (Gly) - NaOH 緩衝液 (pH 4.0～12.0) に FAO-Q1 または FAO-Q2 を加え、30℃、10 分間インキュベートした後、通常の条件 (30℃、pH 8.0) で活性を測定することにより調べることができる。

###### 温度条件の測定

酵素の温度条件は、0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で 25 ~ 60 °C の温度条件に FAO-Q1 または FAO-Q2 を加え、10 分間インキュベートした後、通常の条件で活性を測定することにより調べることができる。

上記方法で測定したとき、FAO-Q1 の、好適な pH は約 7 ~ 9、好ましくは約 7 ~ 8、より好ましくは約 7.5 である。

また、FAO-Q2 の好適な pH は約 6.5 ~ 9、好ましくは約 7 ~ 8、より好ましくは約 7 である。

FAO-Q1 および FAO-Q2 の好適な温度は約 30 ~ 40 °C である。

#### 【0021】

#### 4. 力価の測定

酵素の力価測定は、例えば、実施例 1 (3) に記載されている、当該技術分野で既知の方法 (速度法) で行うことができる。この方法では、FAO と糖化アミノ酸または糖化ペプチドとの反応によって生成する過酸化水素を、該過酸化水素の存在下で生成するキノン色素による吸光度 (505 nm) に基づいて測定する。キノン色素の分子吸光係数  $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  から、1 分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位 (ユニット: U) とする。

なお、活性の測定は上記の方法に限定されず、その他の方法 (終末法、または酸素吸収量を測定する方法等) を用いても同様に本発明の FAO の酵素活性を測定することができる。

#### 【0022】

本発明の FAO のうち、FAO-Q1 は FV および FZL にほぼ同程度の活性を示すことから、広くアマドリ化合物の分析に有用である。一方、FAO-Q2 は FV に活性があるが FZL には活性を示さないことから、糖化ヘモグロビンを選択的に分析するのに有用である。しかも、FAO-Q2 は、糖化ヘモグロビンの N-末端配列である FVH, FVHL にも活性を示したことから、該酵素を用いれば、糖化ヘモグロビン内部の糖化 ( $\epsilon$  位) を測定することなく、N 末端の糖化のみを測定することができるため、より正確に HbA1c の測定が行える。

#### 【0023】

本発明のFAOを用いて糖化タンパク等のアマドリ化合物を分析するには、既知の方法に従い、アマドリ化合物を含有する試料と、本発明のFAOとを接触させ、酸素の消費量または過酸化水素の発生量を測定すればよい。任意の試料を用いることができ、例えば、血液（全血、血漿または血清）、尿等の生体由来の試料の外、醤油等の食品が挙げられる。特に好ましいのは血液である。

#### 【0024】

本発明のFAOの使用に際して、反応溶液のpHおよび温度は、それぞれ、使用する酵素に適した条件とする。即ち、FAO-Q1の場合、pH約7～9、好ましくは約7～8、より好ましくは約7.5、温度約30～40℃で行う。

また、FAO-Q2の場合、pH約6.5～9、好ましくは約7～8、より好ましくは約7、温度約30～40℃で行う。但し、基質や他の反応条件により適宜変更が可能であり、上記に限定されない。

FAOの使用量は、それぞれ、使用する測定法により適宜選択することができるが、通常、0.1ユニット/ml以上、好ましくは1～100ユニット/mlである。緩衝液としてはTris-HCl等を用いる。

#### 【0025】

本発明のFAOで糖化タンパクを分析するには、あらかじめ断片化処理し、糖が結合したアミノ酸残基またはペプチドを遊離させてから行うことが好ましい。そのような方法は化学的な方法、酵素を用いる方法を含めて、当該技術分野で既知である。しかしながら、本発明のFAO、特にFAO-Q2の場合は、糖化アミノ酸のみならず糖化タンパクの分解産物としての糖化ペプチドにも活性があるため、上記の断片化処理が完璧でなくても良好な精度で測定することができる。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

#### 【0026】

##### 【実施例】

##### 実施例1 FAO産生微生物のスクリーニングと同定

##### (1) FAO産生微生物のスクリーニング

糖化ヘモグロビンの $\beta$ 鎖N末端配列を持つフルクトシルバリナーヒスチジンーロイシン(FVHL)を、VHLのグリコシル化により調製した。そのような方

法は当業者に既知である。

このFVHLを単一の炭素源および窒素源とする培地（FVHL培地）を用いて、土壌よりFVHL資化性菌を分離した。試験管（18mm径）にFVHL培地5mlを入れ、採取した土壌を添加して30℃で48時間、振盪（300rpm）培養した。

（FVHL 培地）

FVHL	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1 g
ビタミン混合物*	0.01% (v/v)
金属溶液**	1.0% (v/v)
蒸留水	適量
全量	1,000ml

（\* ビタミン混合物）

チアミンHCl	1 mg
リボフラビン	2
パントテン酸カルシウム	2
ピリドキシンHCl	2
ビオチン	0.1
p-アミノ安息香酸	1
ニコチン酸	2
葉酸	0.1
蒸留水	適量
全量	100 ml

（\*\* 金属溶液）

MnSO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	1.7 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.2

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.4
$\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.28
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.26
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.4
KI	0.06
蒸留水	適量
全量	1,000 ml

その結果、FVHLを資化する13株を得た。それらを下記の培養、活性確認に供し、FAO活性を有する物質を産生する菌株をさらに選抜した。

#### 【0027】

##### (2) 培養および粗酵素液の調製

上記(1)で得た株をグルコースーバリン(GV)褐変化培地で培養し、粗酵素液を調製した。

##### (GV褐変化培地)

グルコース	1.5 % (w/v)
L-バリン	0.5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01
酵母エキス	0.2

試験管(18mm径)にGV褐変化培地5mlを入れ、30℃で24時間、振盪培養(300rpm)した。次いで、フィルターでろ過して菌糸体を回収し、ミニビードビータ(ガラスビーズ0.5mm)で菌糸体を破碎し、遠心分離(4℃、10,000g、10min)して無細胞抽出液を調製し、粗酵素液として使用した。

#### 【0028】

##### (3) FAO活性の測定

粗酵素液のFAO活性を前記の速度法で測定した。即ち、以下の混合物中で生



成する過酸化水素を比色法で経時的に測定し、FAO活性を確認した。

Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0)	100 $\mu\text{mol}$
4-アミノアンチピリン	4.5 $\mu\text{mol}$
フェノール	6 $\mu\text{mol}$
FV	5 $\mu\text{mol}$
パーオキシダーゼ	6 units
酵素液 (無細胞抽出液)	1 ml
全量	3 ml

酵素液以外の混合物 (全量 3 ml) を 30℃ で平衡化した後、酵素液を添加し、505 nm における吸光度を経時的に測定した。生成するキノン色素の分子吸光係数 ( $5.16 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) から、1 分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位 (ユニット: U) とした。その結果、FAO を有する 1 つの株を得た。

#### 【0029】

##### (4) 株の同定

ポテトデキストロース寒天 (PDA)、オートミール寒天 (OA)、および 2% 麦芽寒天培地 (MEA) の各プレートに播種後、25℃ で最長 8 週間培養し、菌学的特性を観察した。コロニーの色調に関する記述は Komerup & Wanscher (1978) に従った。

(コロニーの巨視的特徴の観察)

・全縁が滑らかで僅かに、凸状の盛り上がりを示した。

気中菌糸 (aerial hypha) は綿毛状で、コロニー表面の色調は当初より、White-reddish white (11A1-2) を示した。その後、8 週間経過後も明らかな呈色度合いの変化、および分生子 (conidia) の着生による表面色調の変化は観察されなかった。

・コロニー裏面の色調は表面とほぼ同等で、PDA、MEA 培地における長期間の培養では、若干 pale red (11A3) 呈色が観察された。また、PDA、OA プレートからは、僅かに透明な滲出液 (exudate) の産生が認められた。

(コロニーの微視的観察)

・小型分生子 (microconidia) と大型分生子 (macroconidia) の両方が観察された。

・小型分生子は、フィロア型 (phialidic) で *Acremonium* 属様の分生子柄 (conidiophore) の構造であった。分生子柄はほぼ単生で時折り 2 軸に分枝し、気中菌糸の全般にかけて生じた。1～2 細胞性で粘性を持っており、柄先端より塊状となった。形状は楕円形 (ellipsoidal) から紡錘形 (fusiform) で、表面は平滑 (smooth) からやや粗面 (slightly rough) であった。

・大型分生子は *Fusarium* 属の大型分生子の形態で、3～6 細胞性で三日月型 (luniform) で、表面は平滑、脚胞 (footcell) を有した。気中菌糸部に中厚からやや細く、短いものが多く観察された。また、細胞壁が脆弱で、大半の大型分生子は表面が欠損していた。

Arx (1974)、Domish (1993) および Malloch (1981) に記載されている分類体系に基づいて、上記の結果を考察し、本菌株は *Fusarium* 属に帰属すると推定された。同様の形態を示すものに *Cylindrocarpon*、*Candelabrella*、*Monacrosporium*、*Trichophoron* 等が挙げられるが、本菌株は大型分生子が三日月型であること、気中菌糸が輪 (ring) を形成しないこと、また、小型分生子を形成すること、等からこれらとは区別され、“Gene of Hyphomycetes” (Carmichael et al., 1980) に記載の *Fusarium* 属の定義に合致するものである。

この菌株を *Fusarium* sp. GL2-1 株と命名した。本菌株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 FERM P-19005 の下で寄託されている (受託日: 平成 14 年 9 月 9 日)。

#### 【0030】

実施例 2 GL2-1 株を用いる FAO の生産と同定

##### (1) FAO の部分精製

##### 1) 培養と無細胞抽出液の調製

実施例 1 で同定した GL2-1 株を、実施例 1 (2) に記載の GV 褐変培地 100 ml を用いて、同様の培地組成、培養条件下で培養した。

培養後、培養液をフィルターでろ過して菌糸体を回収し得られた菌糸体 0.6 g を 1 mM DTT を含む 0.1 M Tris-HCl (pH8.0) に懸濁して、ミニビー

ドビータ（ガラスビーズ0.5mm）で菌糸体を破碎し、遠心分離（4℃、10,000g、10min）し、上清を無細胞抽出液とした。

【0031】

2) 硫安分画

1) で得た無細胞抽出液を、硫酸アンモニウム濃度30～80%飽和画分を1mMのDTTを含む50mMTris-HCl（pH8.0）に溶解し、同緩衝液で一晩透析した。

【0032】

3) Resource Qカラムクロマトグラフィー

以下の条件で透析後の硫安画分のクロマトグラフィーを行った。

分析条件

カラム（容量）： Resource Qカラム（1ml）（ファルマシア製）  
流速： 1ml/min  
緩衝液A： 50mM Tris-HCl（pH8.0）+1mM DTT  
緩衝液B： 緩衝液A+1M NaCl

溶出条件

0～5min： 緩衝液B 0%  
5～35min： 緩衝液B 0～50%  
35～40min： 緩衝液B 50～100%

Resource Qカラムクロマトグラフィーにおけるタンパク（OD=280nm）と活性の溶出パターンを図1に示す。FVを基質としたFAO活性で活性をモニターしたところ、2つの画分（Q1、Q2）に反応性が認められた。活性の測定は実施例1（3）に記載の方法に準じて行った。これらの画分に含有されるFAOをFAO-Q1、FAO-Q2と呼称する。

【0033】

【表1】

表 1 精製段階による活性の変化

工程	total unit(U)		比活性 (U/mg)	収率 (%)
無細胞抽出液	0.5		0.019	100
30～80%硫酸分画透析後	0.3		0.0199	60
Resource Q	1	0.22	0.3	44
	2	0.03	0.067	6

## 【0034】

## (2) FAO-Q1およびFAO-Q2の基質特異性の比較

上記の(1)、3)で分離した2つの画分に含有される酵素(FAO-Q1, FAO-Q2)の基質特異性を調べた。酵素液として、上記2つの画分を用い、実施例1(3)に記載の方法に従って、FAO活性を測定した。基質として、FV、FVH、FVHL、FVL、FVLS、FZLを用いた。結果を表2に示す。

## 【0035】

【表2】

表 2 FAO-Q1、FAO-Q2の基質特異性

	相対活性 (%)	
	FAO-Q1	FAO-Q2
FV	100	100
FVH	n.d.	2.4
FVHL	n.d.	0.6
FVL	1.1	0.6
FVLS	n.d.	3.3
FZL	108	n.d.

FV:フルクトシルバリン、FVH:フルクトシルバリンーヒスチジン、FVHL:フルクトシルバリンーヒスチジンーロイシン、FVL:フルクトシルバリンーロイシン、FVLS:フルクトシルバリンーロイシンーセリン、FZL:フル

クトシルN- $\alpha$ Zリジン

n.d.: 検出せず

表2から、FAO-Q1はFVおよびFZLの両方に同程度の活性を有し、かつFVLにも活性を示すこと、FAO-Q2はFVには活性があるがFZLには活性を示さず、FVH、FVHLというN-末端バリンが糖化されたペプチドにも活性を示すことが明らかである。

#### 【0036】

##### 【発明の効果】

本発明により新たなフルクトシルアミノキシダーゼが提供され、アマドリ化合物の分析の発展に寄与することができる。特に、本発明のフルクトシルアミノキシダーゼのうち、糖化アミノ酸のみならず糖化ペプチドに対しても活性を有するものは、糖化タンパクの分解が不完全な場合であっても糖化タンパクをより正確に測定することを可能にし、例えば、糖尿病における血糖値コントロールに重要なHbA1cのより正確な測定を可能にし、延いては糖尿病患者に対する治療、合併症の予防に貢献するものである。

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】 *Fusarium* sp. GL2-1株の培養物の、Resource Qカラムクロマトグラフィーにおけるタンパク (OD=280nm) と活性の溶出パターンを示す図である。

【書類名】 図面

【図1】

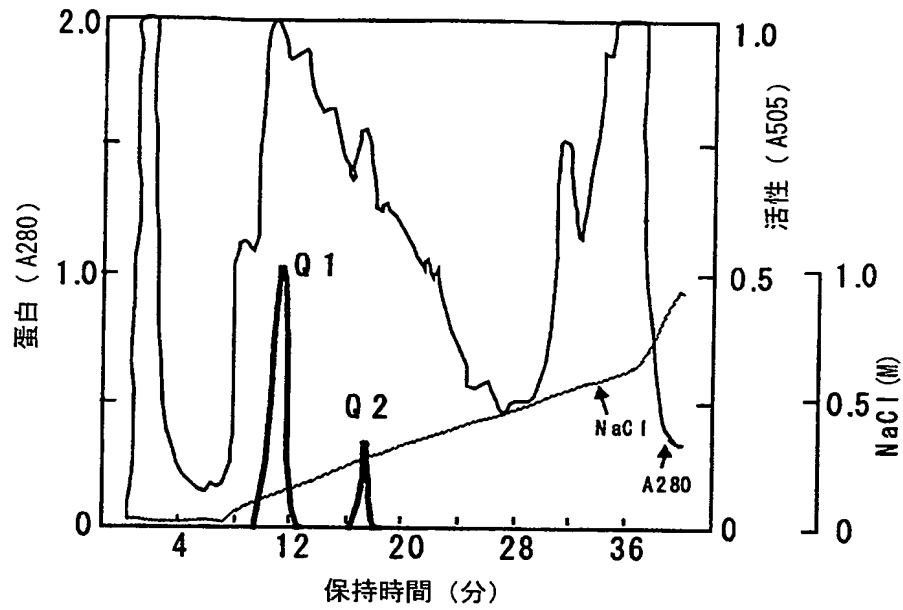


図1 : Resource Q カラムクロマトグラフィー

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れた活性を有するフルクトシルアミノキシダーゼを提供する。  
。

【解決手段】 フルクトシルバリンーヒスチジンーロイシンに対して資化能を有するフサリウム属の菌株により産生される、糖化アミノ酸、糖化ペプチドに対して活性なフルクトシルアミノキシダーゼ。

【選択図】 なし

特願 2002-277214

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000141897]

1. 変更年月日

2000年 6月12日

[変更理由]

名称変更

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

氏 名

アークレイ株式会社